

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 06-321700

(43)Date of publication of application : 22.11.1994

(51)Int.Cl.

C30B 29/58

C30B 30/08

(21)Application number : 05-115922

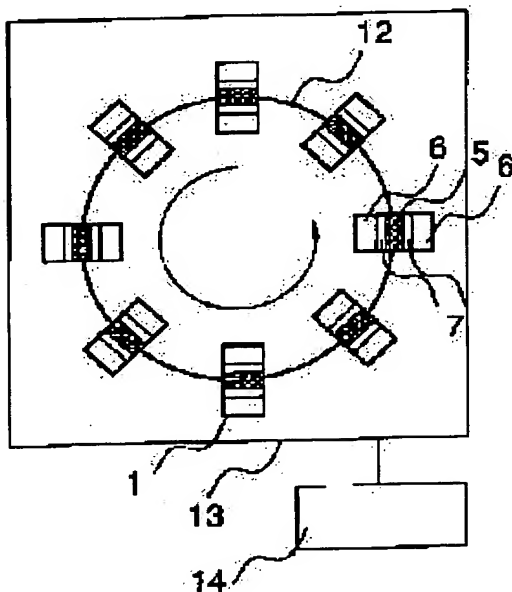
(71)Applicant : HITACHI LTD

(22)Date of filing :

18.05.1993

(72)Inventor : HARADA YOSHINORI

(54) CRYSTAL GROWTH METHOD AND DEVICE THEREFOR



(57)Abstract:

PURPOSE: To set a pseudo microgravity environment and to inexpensively grow good-quality crystals by forming sandwich structure of gels contg. the materials to be crystallized and settling agent gels, and turning vessels for crystallization upside down at prescribed periods.

CONSTITUTION: The gels 6 contg. settling agents, such as protein, and the gels 7 contg. buffer solns. are superposed on each other and are put into the vessels 1 for crystallization. The gels 5 contg. the protein and nucleic acid to be crystallized or the compds. composed of these constituting elements are placed thereon; further, the gels 7 of the buffer solns. and the settling agent gels 6 are superposed on each other or the sandwich structures are formed of the gel fragments 5 contg. the protein to be crystallized and separated by a gel electrophoresis method from the settling agent gels and protein mixture samples as well as the settling agent gels 6 or settling agent solns. These vessels are then loaded on a turn table 12 perpendicular to gravity and are continuously or intermittently rotated while the vessels are kept at a constant temp. by a rotating speed and temp.

controller 14 within a thermostatic chamber 13. The vessels 1 for crystallization are turned upside down at the prescribed periods to minimize convection. The isotropically grown single crystals having the high quality are thus obtd.

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平6-321700

(43) 公開日 平成6年(1994)11月22日

(51) Int. Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 3 0 B. 29/58		8216-4G		
30/08		8216-4G		

審査請求 未請求 請求項の数5 O L (全 5 頁)

(21) 出願番号 特願平5-115922

(22) 出願日 平成5年(1993)5月18日

(71) 出願人 000005108

株式会社日立製作所

東京都千代田区神田駿河台四丁目6番地

(72) 発明者 原田 義則

埼玉県比企郡鳩山町赤沼2520番地 株式会社日立製作所基礎研究所内

(74) 代理人 弁理士 小川 勝男

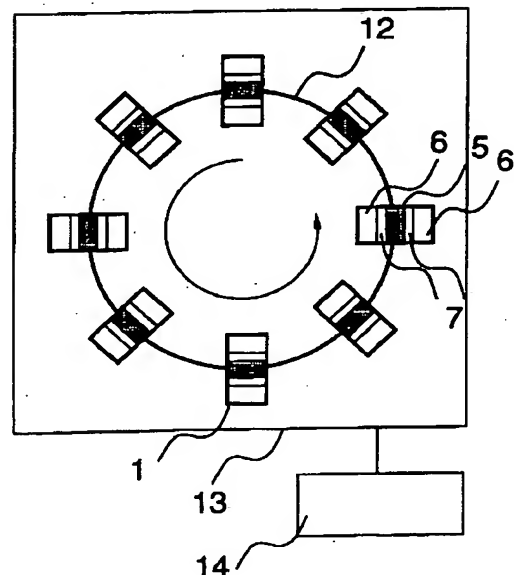
(54) 【発明の名称】 結晶成長方法および装置

(57) 【要約】

【目的】 蛋白質、核酸あるいはこれらを主たる構成要素とする生体高分子化合物の結晶化において微小な結晶核の移動と結晶化溶液内の対流を防止し、結晶成長の核となる微小結晶の過剰生成防止と少数の結晶の等方的成長を促進すること。

【構成】 結晶化すべき物質を溶解した緩衝液5に、アクリルアミド、アガロース、或いは、テトラメトキシシラン等を添加し、結晶化すべき物質をゲル中に固定化した後、冷却、加熱、或いは、ゲル中に含ませた沈殿剤6の拡散等で、目的とする物質をゲル中において過飽和状態にしてゲル中で結晶化させる。

【図4】



【特許請求の範囲】

【請求項1】結晶化容器内に沈殿剤ゲルと、結晶化すべき蛋白質、核酸、或いはこれらを主たる構成要素とする化合物を含むゲルと沈殿剤ゲルとよりなるサンドイッチ構造を形成し所定の周期で結晶化容器の上下を反転させてゲル中で結晶成長させることを特徴とする結晶化方法。

【請求項2】ゲル間に緩衝液ゲルがはさまれたことを特徴とする請求項1記載の結晶化方法。

【請求項3】結晶化容器内に沈殿剤ゲル、蛋白質混合物試料からゲル電気泳動法にて分離された結晶化すべき蛋白質を含むゲル断片5および沈殿剤を含むゲル或いは沈殿剤溶液1よりなるサンドイッチ構造を形成し所定の周期で上下を反転させてゲル中で結晶成長させることを特徴とする結晶化方法。

【請求項4】結晶化すべき蛋白質、核酸、或いはこれらを主たる構成要素とする化合物をゲル状態で収納した結晶化容器、前記結晶化容器を装着した重力に対しほぼ垂直に設けられ回転可能な回転板、前記回転板の回転を制御する制御装置よりなることを特徴とする結晶化装置。

【請求項5】前記回転板を連続的、或いは間歇的に回転させることを特徴とする請求項4記載の結晶化装置。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】生体における諸々の反応は、蛋白質や核酸などの高分子物質の働きで制御されている。これら生体高分子の活性や機能を原子レベルの立体構造に基づいて理解することにより生体反応を分子のレベルで解釈できるので、立体構造解析は疾病の原因究明、治療や天然の生体高分子を手本とした医薬品の分子設計、生産に多に寄与する。

【0002】原子レベルの立体構造を解析する手段において最も強力なものはX線結晶構造解析法であるが、本解析法を適用するためには、解析対象物質を結晶化し、各辺の寸法が0.1～1mm程度の大きさの単結晶を得なければならない。生体高分子は一般的に結晶化が困難であり、また、たとえ結晶化しても微小結晶、或いはアモルファス結晶しか得られないことが多くX線構造解析に適さない。

【0003】本発明はX線結晶構造解析の他、分子、及び結晶の物性解析を行うための分析に適した大きなサイズの生体高分子の結晶を効率的に得る結晶化方法及び装置を提供する。

【0004】

【従来の技術】物質の溶媒からの結晶化はなんらかの方法により溶質を過飽和状態にすることで達成される。特に生体高分子の場合、X線結晶構造解析に適した結晶を得ることは困難で(1)結晶核が生成しにくい、(2)結晶核が成長しにくい、(3)単結晶になりにくい等の性質がある。

【0005】結晶化法は大別して外的物理条件を徐々に変化させる方法と結晶化溶液内の化学的組成を変化させる方法がある。これまで溶質である生体高分子の溶解度を下げるために様々な方法が提案されてきている。具体的には(1)濃縮法、(2)温度勾配法、(3)静置バッチ法、(4)透析法、(5)透析拡散法、(6)蒸気拡散法、(7)自由界面拡散法(生化学実験講座、1、日本生化学会編、東京化学同人、pp.9-17(1976))などが開発されている。しかし、依然として結晶化が極めて困難な物質が多く、構造解析研究、引いては生体高分子が関与する生理現象の研究の進行上の大きなネックとなっている。

【0006】いずれの結晶化方法においても、結晶成長に伴う結晶近傍の密度の減少とそれにより生ずる対流、或いは温度勾配による溶媒の密度分布の不均一性によって対流が生じない微小重力環境下での結晶化による拡散律速結晶化が構造解析に適した結晶を得る上で有効であると推測され、検討されている(Science, 246, pp. 651-654(1991))。

【0007】しかし、一般的に長時間、微小重力状態を持続するためには宇宙空間での作業が必要であり、実験機会を得ることは甚だ困難である。一方、結晶母液内の対流を最小限に抑えるために、ゲル中で結晶成長させることが試みられてきており、リゾチームなど結晶性の良い蛋白質については一定の成功を収めてきた(C. R. Acad. Sci. Paris, t. 305, Serie II, pp. 847-850(1977))。しかし、一般に結晶成長に要する時間は数日から、数週間かかり、たとえゲル中とはいえ、その期間内にわたり対流を完璧に抑えることはできない。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】蛋白質、核酸あるいはこれらを主たる構成要素とする生体高分子化合物は本質的に結晶化しにくく、また、たとえ結晶化したとしても微小結晶であったり、アモルファス結晶であったりして、構造解析に適さない結晶である場合が多い。その大きな原因の一つに結晶成長に伴って生ずる結晶母液内の対流があると考えられている。即ち、対流による結晶核、ゴミ等の散逸、生じた微結晶の非等方的成長が大きな短結晶の成長を妨げている原因と考えられている。

【0009】本発明はこれらの悪影響を最大限に低減して、通常の地上実験では生成が困難な結晶を成長させたり、非等法的結晶成長性を示す結晶を等法的に成長させるためのものである。

【0010】

【課題を解決するための手段】図1に示す通り、静置バッチ法にて結晶を成長させる場合、通常の底のある容器1内で結晶成長させると、成長に伴い結晶2近傍の溶液

10

20

30

40

50

内の溶質が結晶表面に析出することで局所的に結晶化母液3の密度が減少する。一般に、結晶の比重は結晶化母液より大きいので結晶は沈降し、容器の底面に接触する。その結果、結晶近傍において対流4が生ずる。この対流により横方向から溶質が供給され続ける結果、本来、等方的に成長する晶癖を持つ結晶でも等方的に成長せずに扁平となる場合が多い。

【0011】また、米国NASAによるスペースシャトルでの実験によれば、微小重力条件下で雪の結晶成長を行わせると地上で通常見られる針状結晶ではなく等方的に成長した雪の結晶が得られるという。これは結晶成長の過程において空気の攪拌が起らず、気中の飽和水蒸気が自由拡散しつつ結晶核に等方的に吸着したためと考えられている。

【0012】これらの例のように、構造解析に適する等方的に成長した結晶を得るためには結晶化条件を拡散律速にすることが望ましい。通常の実験室にて、結晶化を行う場合、本質的に重量の影響を除外することは出来ない。

【0013】しかし、結晶化すべき物質を溶解した緩衝液に、アクリルアミド、アガロース、或いは、テトラメトキシシラン等を添加し、結晶化すべき物質をゲル中に固定化した後、冷却、加熱、或いは、沈殿剤の添加等で、目的とする物質をゲル中において過飽和状態にしてゲル中で結晶化させることができる。この場合、ゲルの篩効果により、微結晶の沈降が妨げられたり、結晶核となりうる微小なチリなどの拡散を防止できることで微小な結晶の過剰生成を防止できるので、地上にても結晶化母液内における対流の影響をある程度除去できたことになる(J. Crystal Growth, 90, p. 358-367 (1988))。

【0014】しかし、ゲルの網目をくぐり抜ける溶媒、溶質分子に起因する結晶化母液内の密度分布の不均一性に依存する対流は依然として残る。そこでさらに、これらを格納する結晶化容器全体を対流をキャンセルする方向に連続的に或いは、間歇的に回転させることで対流の影響を最小限に抑えることが出来る。その結果、等方的に成長した高品質の大きな単結晶を得ることが可能となる。

【0015】

【作用】結晶化溶液内での対流の速度は小さいので、結晶化の途中で結晶化容器を連続的、或いは間歇的に上下方向を逆転させ、対流を最小限に抑えることができる。本発明では特に、ゲル中で結晶成長させるために、結晶化容器を回転装置に装填し、回転させても結晶化母液内での溶液の乱れは殆ど生じない。その結果、結晶成長を擬似的に拡散律速にすることが出来るため、結晶の等方的成長が期待できる。また、ゲル中で、結晶成長させる場合、不純物や、一旦生成した結晶が、機械的刺激で、破碎し、生じた微結晶が、あらたな結晶の成長核となる

可能性も低減できる。その結果、同じ量の試料を使っても、少数の大きな結晶を得ることが可能となる。

【0016】

【実施例】

実施例1

本発明の一実施例を図2により説明する。蓋10で密封できる容器1に蛋白質の沈殿剤、例えば8%の塩化ナトリウム、及び0.1モルのリン酸緩衝液(pH4.7)を含む8%アクリルアミドゲル6を入れ、次いで0.1モルのリン緩衝液のみを含む5%アクリルアミドゲル7を重ねた上に1.3%の卵白リゾチーム、及び0.1モルのリン緩衝液を含む5%アクリルアミドゲル5を乗せる。さらに、0.1モルのリン緩衝液を含む5%アクリルアミドゲル7と8%の塩化ナトリウム、及び0.1モルのリン酸緩衝液を含む8%アクリルアミドゲル6を重ねて、沈殿剤ゲル、緩衝液ゲル、蛋白質ゲル、緩衝液ゲル、沈殿剤ゲルのサンドイッチ構造を作り、容器を密封する。

【0017】ゲルを充填した容器全体を恒温、例えば、4℃、或いは、30℃に保ちながら、連続的、或いは間歇的に容器の上下方向を変換する。蛋白質分子の拡散速度8は沈殿剤分子の拡散速度9より約1桁は小さいので結晶化は蛋白質を含むゲル5の内部で起こる。数日の後、結晶がゲル5中に生成するので、これをゲルより取り出すか、或いはゲルに包埋したまま分析に供する。

【0018】本実施例において緩衝液のみを含むゲル層7の存在は必須ではなく、省略することも可能である。

【0019】ゲルの調製方法としては緩衝液、沈殿剤、或いは蛋白質を含む、テトラメチルシラン単量体、或いはアクリルアミドの単量体溶液を重合させてゲル化する方法の他、前もってゲルを調製しておき、これを緩衝液、沈殿剤、或いは蛋白質溶液に浸漬することでこれらを含むゲルを調製することが出来る。アガロースゲルの場合には融解したゲルに緩衝液、沈殿剤、或いは蛋白質を添加する、或いは緩衝液、沈殿剤、ないしは蛋白質溶液に粉末のゲルを添加した後、加熱融解し、冷却することで緩衝液、沈殿剤、或いは蛋白質を含むゲルを調製する。

【0020】熱変性し易い蛋白質の場合には低融点アガロースゲルを使用する。緩衝液、及び沈殿剤のみを含むゲルのゲル濃度に関しては特に制約は無いが、蛋白質を含むゲルに関しては結晶に対し、強い応力が働かないようにするためにゲル濃度はなるべく低いこと、即ちアクリルアミドゲルならば6%以下、アガロースゲルならば1%以下が望ましい。

【0021】実施例2

本発明の他の実施例を図3により説明する。蓋10で密封できる容器1に蛋白質の沈殿剤、例えば3モルの硫酸アンモニウムを含む8%アクリルアミドゲル6を入れ、次いで蛋白質混合物試料からゲル電気泳動法にて分離精

製し、ゲル板より切り出したチトクロームc 1%を含むゲル断片5を重層する。さらにこの上部に、沈殿剤を含むゲル、或いは、沈殿剤溶液11そのものを乗せ、蓋10をする。この容器全体を恒温、例えば、4℃に保ちながら、連続的、或いは間歇的に容器の上下方向を変換する。蛋白質分子の拡散速度は沈殿剤分子の拡散速度より約1桁は小さいので結晶化は蛋白質を含むゲル5の内部で起こる。数日の後、結晶がゲル5中に生成するので、これをゲルより取り出すか、或いはゲルに包埋したまま分析に供する。

【0022】本実施例では混合物からの分離に使用したゲルの中から蛋白質を抽出精製すること無しに直接結晶化に使用できる。ゲルの上部に乗せる沈殿剤がゲル状ではない場合には、蛋白質を含むゲル5は容器の上下方向の変換のたびに、沈殿剤溶液11の中を動き回ることになるがゲル内部における結晶化には影響ない。数日の後、結晶がゲル5中に生成するので、これをゲルより取り出すか、或いはゲルに包埋したまま分析に供する。

【0023】実施例3

本発明の他の実施例を図4により説明する。本装置は、実施例1或いは実施例2で示した結晶化容器を装着する回転台12、設定温度が可変の恒温槽13、及び、回転台の回転速度、恒温槽の温度を制御する装置14からなる。実施例1、或いは実施例2と同様に、調製したゲル、或いは溶液を充填した結晶化容器1を回転台12に装着する。ここで回転台12は重力に対し垂直方向に設けられているので、図2、図3で説明したように、沈殿剤ゲル6、緩衝液ゲル7、蛋白質ゲル5、緩衝液ゲル6、沈殿剤ゲル7のサンドイッチ構造は、回転台12の回転に応じて上下が反転させられるものとなる。ゲル、或いは溶液内の物質移動に大きな影響を与えないために回転装置12の回転速度あるいは間歇的な回転は制御装置14により制御される。また、制御装置14は装置全体の温度を一定に保つことも、さらに予め設定したスケジュール通り温度を変化させることも可能である。

【0024】ゲル、及びゲルに含まれる溶媒、溶質にかかる向心力を最も低減し、回転に伴う新たな溶媒の流れを防止するためには結晶化容器を回転軸上に並べることが有効である。また本実施例では1つの回転軸上に8つの結晶化容器を配置する構成を示したが、本発明は任意の個数について有効である。さらに本実施例では結晶母

液内の密度分布の不均一性に起因する対流の極小化が可能なので、実施例1、2で述べた拡散法による結晶化法その他、濃縮法、温度勾配法、ハンギングドロップ法、透析法、透析拡散法、蒸気拡散法等のこれまで適用されて来た結晶化法の内、容器を逆さにした状態で流出する程度の結晶化母液量を用いる静置バッチ法以外のすべての結晶化法に適用可能である。

【0025】

【発明の効果】物質の結晶化において等方的結晶成長に阻害的に働く結晶母液内の対流は無重力空間では抑えられる。一般に微小重力環境を設定するためには、航空機、ロケット等の弾道飛行、落下塔、宇宙空間利用等の方法がある。ところが蛋白質等の結晶化に要する時間は長い(数日~数週)ので、良質の蛋白質結晶の成長には宇宙空間利用が最も適当である。しかし、微小重力状態を持続できる宇宙空間の利用には多大の経費がかかる。これに対し、本発明によれば、簡便に擬似微小重力環境が設定できるので、安価な良質の結晶成長が可能となる。

【0026】さらにゲルの篩効果により一旦出来た結晶が機械的衝撃等で破壊されて生じた微結晶、或いは溶媒中のチリ等の移動が抑えられる結果、これらを核として多数の二次的結晶が生成するおそれは小さくなり、少数の核のより大きな寸法の結晶成長が可能となる。

【図面の簡単な説明】

【図1】結晶の近傍に生じ、結晶の等方的成長を阻害する対流を説明する図。

【図2】ゲル中結晶化容器の構造と物質移動を示す図。

【図3】蛋白質を含有するゲルを内部に保持したゲル中結晶化容器の構造図。

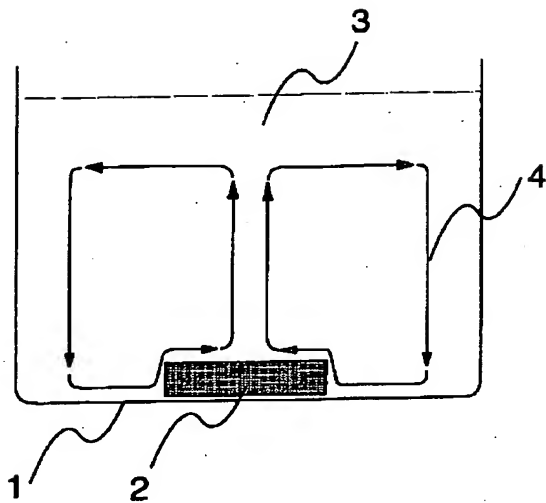
【図4】ゲル中結晶化容器を回転させる結晶成長装置の構造図。

【符号の説明】

1：結晶化容器、2：結晶、3：結晶化母液、4：結晶化母液内に生ずる対流、5：蛋白質を含有するゲル、6：沈殿剤を含有するゲル、7：緩衝液のみを含むゲル、8：蛋白質の拡散方向を示す矢印、9：沈殿剤の拡散方向を示す矢印、10：結晶化容器の蓋、11：沈殿剤溶液、12：結晶化容器回転装置、13：恒温槽、14：回転数、温度制御装置。

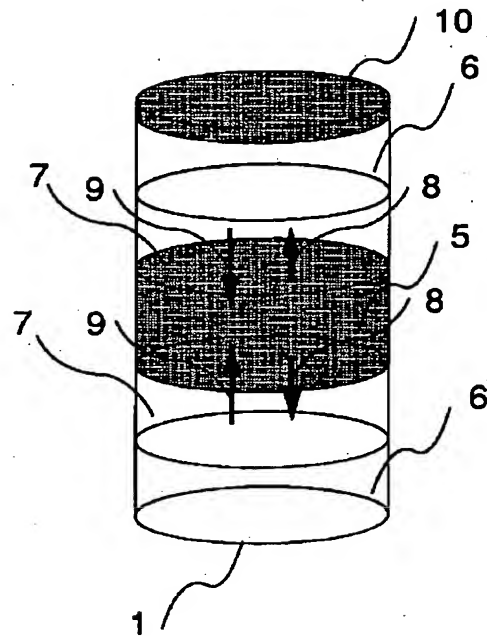
【図1】

【図1】



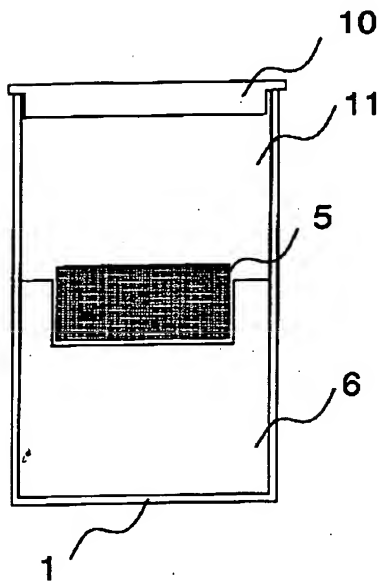
【図2】

【図2】



【図3】

【図3】



【図4】

【図4】

